



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



PATENT TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1647
Examiner : Bridget E. Bunner
Serial No. : 09/655,272
Filed : September 5, 2000
Inventors : Eric Honore
: Michel Fink
: Michel Lazdunski
: Florian Lesage
: Fabrice Duprat
Title : MECHANOSENSITIVE
: MAMMALIAN POTASSIUM
: CHANNELS ACTIVATABLE
: BY POLYUNSATURATED
: FATTY ACIDS AND THE USE
: OF SAID CHANNELS IN
: DRUG SCREENING

Docket No.: 1383-00

Confirmation No.: 8032

Dated: September 17, 2002

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

For

Postcard

Claim for Priority Under 35 U.S.C. §119
Certified Copy of French Appln. No .98/02725

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, Washington, DC 20231, on the date appearing below.

Name of Applicant, Assignee, Applicant's Attorney
or Registered Representative:

Customer No.: 022469

By: _____

Date: _____

17 SEP 2002

1647

RECEIVED

SEP 26 2002

TECH CENTER 1600/23

#13
A. J. J
9/27/02



13

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



PATENT TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1647
Examiner : Bridget E. Bunner
Serial No. : 09/655,272
Filed : September 5, 2000
Inventors : Eric Honore
 : Michel Fink
 : Michel Lazdunski
 : Florian Lesage
 : Fabrice Duprat
Title : MECHANOSENSITIVE
 : MAMMALIAN POTASSIUM
 : CHANNELS ACTIVATABLE
 : BY POLYUNSATURATED
 : FATTY ACIDS AND THE USE
 : OF SAID CHANNELS IN
 : DRUG SCREENING

Docket No.: 1383-00

Confirmation No.: 8032

Dated: September 17, 2002

RECEIVED

SEP 26 2002

TECH CENTER 1600/2900

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

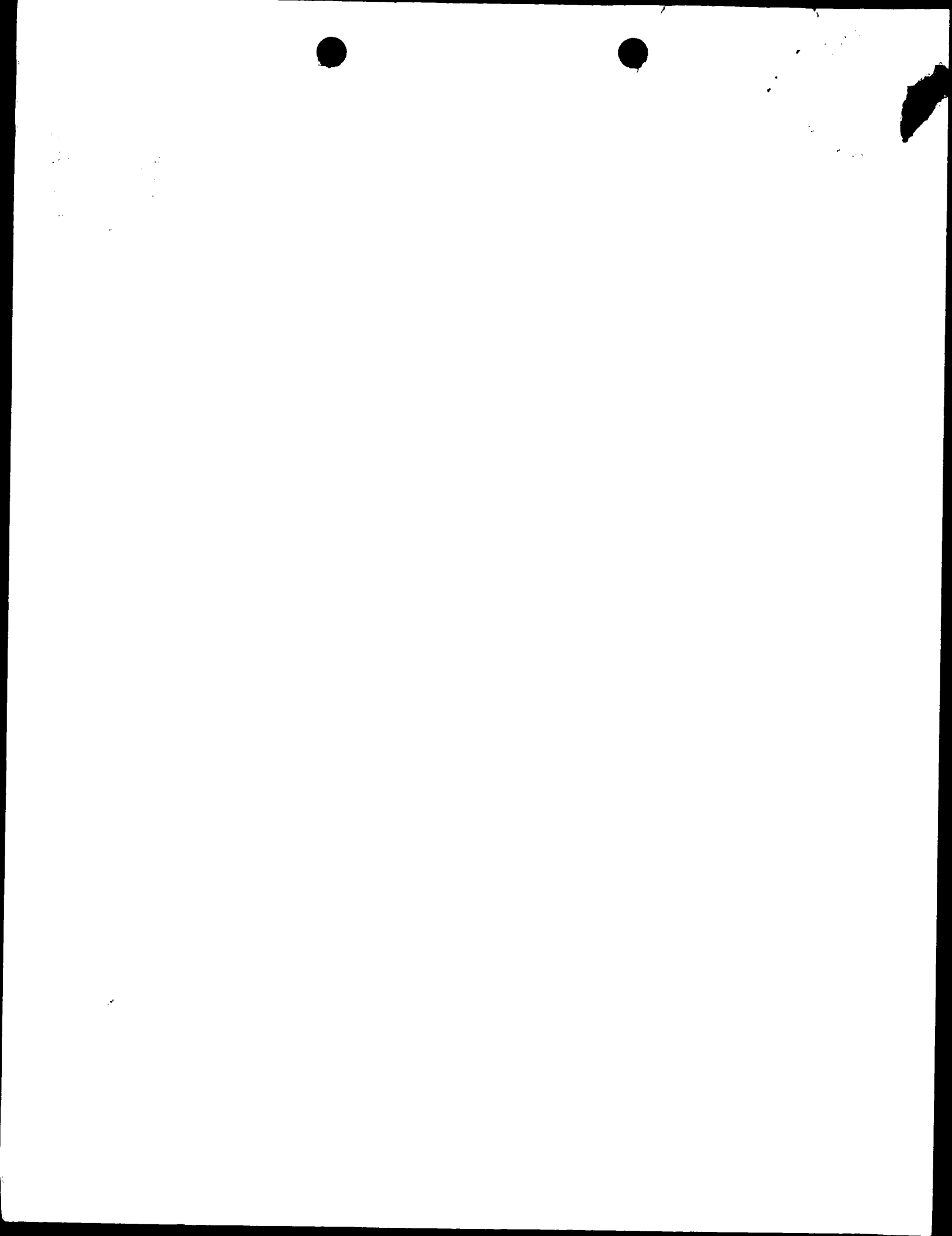
Sir:

We submit herewith the certified copy of French Appln. No. 98/02725, filed March 5, 1998, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 563-1810



09/655272



RECEIVED

SEP 26 2002

#13

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 05 avril 2002

Fait à Paris le 06 SEP. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

[Faint, mostly illegible text covering the page, possibly bleed-through from the reverse side. Some fragments are visible, such as "The following information was obtained from the records of the Department of the Interior" and "The following information was obtained from the records of the Department of the Interior".]

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

05 MAR 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 02725 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

05 MARS 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

F17BD1296FR 01.47.03.67.77

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐

oui

☐

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET
ACTIVES PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT
POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

3, rue Michel Ange
75794 PARIS Cedex 16

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐

requis antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Pierre BREESE
921038

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cedex 08

Tel. 01 53 04 53 04 - Télécopie 01 42 93 59 30

F17B1296FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98/02725

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET ACTIVES PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE-MAJEROWICZ

3, avenue de l'Opéra

75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

HONORE Eric

43, bd Bijou Plage - Villa "Le Nid"

06160 JUAN LES PINS

FINK Michel

"Les Amaryllis", Bât. B2

5, Chemin des Courgettes

06150 CANNES LA BOCCA

LAZDUNSKI Michel

21, avenue Colombo

06000 NICE

LESAGE Florian

Palais Flora

12, avenue Auber

06000 NICE

DUPRAT Fabrice

1 les Tamaris

06220 VALLAURIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 27 Novembre 1998

Pierre BREESE

921038

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE
MAMMIFERES MECANOSENSIBLES ET ACTIVES PAR LES ACIDES
GRAS POLYINSATURES ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE
CRIBLAGE DE DROGUES.

5

La présente invention concerne une nouvelle
classe de canaux potassium mécanosensibles activés par
les acides gras polyinsaturés. L'invention est basée sur
la découverte d'un nouveau canal potassium, dénommé
10 TRAAK pour TWICK-Related AA-Activated K^+ channel,
mécanosensibles activés par les acides gras
polyinsaturés et également par le riluzole qui est un
agent neuroprotecteur. Les propriétés des canaux de la
famille TRAAK ainsi que leur distribution tissulaire
15 confère à ces canaux un rôle primordial dans le
transport de potassium chez un grand nombre de types
cellulaires.

Les canaux potassium sont des protéines
20 ubiquitaires et leur exceptionnelle diversité
fonctionnelle en font des candidats idéaux pour un grand
nombre de processus biologiques. Ils interviennent
notamment dans la régulation de l'excitabilité neuronale
et musculaire, sur le rythme cardiaque et sur la
25 sécrétion d'hormone. Trois types structuraux de canaux
potassium ont été décrits chez les mammifères. Le
premier est le type "Shaker" qui est composé de sous-
unités ayant 6 segments transmembranaires et un domaine
P qui est impliqué dans la formation du pore ionique. Le
30 second est le type IRK à deux segments transmembranaires
et un domaine P. Le troisième a été décrit plus
récemment et correspond au type TWIK qui a quatre
segments transmembranaires et deux domaines P. Trois
canaux de ce type ont été identifiés : TWIK-1 (Fink, M.
35 et al. EMBO J. 15, 6854-6862 (1996)), Lesage, F. et al.

EMBO J. 15, 1004-1011 (1996) TREK-1 et TASK (Duprat, F. et al. EMBO J. 16, 5464-5471 (1997)). En dépit d'une structure générale conservée, ils ont des séquences primaires peu similaires, puisqu'ils présentent entre 20 à 25 % d'identité en acide aminé.

La présente invention est fondée sur la découverte et le clonage d'un nouveau canal désigné TRAAK, membre de la famille des canaux TWIK. Le gène codant ce canal est plus particulièrement homologue au niveau de sa séquence d'acides aminés au canal TREK-1 avec lequel il présente 38% d'identité en acide aminé. Le présente invention est également fondée sur les propriétés électrophysiologiques uniques de ces deux canaux TREK-1 et TRAAK. En effet, ces canaux produisent tous les deux des courants sélectifs au potassium qui sont activés par une tension appliquée à la membrane cellulaire, canaux dits mécanosensibles, ou par l'application d'acides gras polyinsaturés, notamment l'acide arachidonique qui est un messenger essentiel de la communication inter- et intra-cellulaire et un important modulateur de l'excitabilité neuronale (Ordway, R. W., Singer, J. J. et Walsh, J. V. 14, 96-100 (1991), Bliss, T. V. P. et Collingridge, G. L. Nature 351-39 (1993), Piomelli, D. Curr. Opin. Cell. Biol. 5, 274-280 (1993), Meves, H. Prog. Neurobiol. 43, 175-186 (1994), Piomelli, D. Crit. Rev. Neurobiol. 8, 65-83 (1994). Ces canaux sont également ouverts par le riluzole qui est un agent neuroprotecteur (Malgouris, C. et al. J. Neurosci. 9, 3720-3727 (1989), Pratt, J. et al. J. Neurosci. Lett. 140, 225-230 (1992) utilisé en clinique pour prolonger la survie de malades atteints de sclérose latérale amyotrophique.

La mise en évidence de cette nouvelle classe de canaux potassium et l'expression hétérologue de ces

canaux permet notamment de disposer de nouveaux moyens pour rechercher par criblage des drogues capables de moduler l'activité de ces canaux potassium et donc de prévenir ou de traiter des maladies impliquant ces canaux, comme l'épilepsie, les pathologies cardiaques (arythmies) et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires.

La présente invention a donc pour objet une protéine purifiée constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. Plus particulièrement, l'invention concerne la protéine constituant le canal TRAAK dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés du canal TRAAK. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal TRAAK. Un tel dérivé est plus particulièrement le canal TREK-1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2.

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal

ionique de l'invention peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal TRAAK et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal TRAAK dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine TRAAK est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement, une telle séquence d'acide nucléique comprend la séquence comprise entre les nucléotides 284 et 1477 de SEQ ID No:1 ou sa séquence complémentaire.

Une autre séquence d'acide nucléique selon l'invention comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal TREK-1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence

codant pour la protéine TREK-1 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement, une telle séquence d'acide nucléique comprend la séquence comprise entre les nucléotides 484 et 1596 de SEQ ID No:2.

L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal potassium,
- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux potassium de l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'un canal ionique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression des canaux potassium de l'invention.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide.

L'invention concerne donc aussi les hôtes cellulaires et plus particulièrement les cellules transformés exprimant des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TRAAK obtenues conformément aux procédés précédents. Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler les courants des canaux TRAAK. Ce criblage est effectué en mettant en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux de l'invention, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants potassium desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et font aussi l'objet de la présente invention dès lors qu'elles mettent en oeuvre les canaux TRAAK ou leurs dérivés. Ce procédé de criblage permet d'identifier des drogues capables de moduler l'activité des canaux potassium de l'invention et donc susceptibles de prévenir ou de traiter des maladies impliquant ces canaux. Ces substances et leur utilisation comme médicament, isolés et détectés grâce aux procédés ci-dessus, font également partie de l'invention.

Plus particulièrement, l'invention concerne donc une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal potassium selon l'invention pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal, comme les pathologies cardiaques (arythmies) et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal TRAAK ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux TRAAK, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux surexprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux TRAAK.

Ces animaux transgéniques de même que les hôtes cellulaires décrits précédemment sont utiles en tant que modèles pour l'étude de pathologies associées à ces canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés soient parce qu'ils surexpriment les canaux potassium du type canal TRAAK, soit parce qu'ils présentent une déficience en ces canaux potassium.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal TRAAK peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant ces canaux.

5 L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une de ces protéines éventuellement associée à un véhicule physiologiquement acceptable.

De même, les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une

10 déficience des canaux TRAAK au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les canaux TRAAK et leurs dérivés.

20 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent rapportant le travail de recherche ayant mené à l'identification et à la caractérisation de ces canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras et où il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

25 - la figure 1 et SEQ ID NO:1 représentent la séquence nucléotidique de l'ADNc de TRAAK et la séquence en acide aminé de la séquence codante.

30 la figure 2 représente l'alignement des séquences de TWIK-1, TREK-1, TASK et TRAAK qui sont les quatre canaux du type TWIK actuellement clonés chez les mammifères ainsi que le dendrogramme déduit de cet alignement. Les résidus identiques sont représentés sur fond noir et les résidus conservés sur fond gris.

35

- la figure 3 représente l'analyse par RT-PCR de la distribution de TREK-1 et TRAAK dans les tissus de la souris adulte. Des fragments des transcripts codant TREK-1 et TRAAK ont été amplifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques, transférés sur membrane de nylon puis sondés avec des oligonucléotides internes marqués au phosphore 32.

- la figure 4 montre les propriétés électrophysiologiques des courants TRAAK enregistrés par la technique de voltage imposé sur des ovocytes de Xénope ayant reçu une injection d'ARNc de TRAAK (a, b, c) et sur des cellules COS transfectés avec un vecteur exprimant TRAAK (d, e, f). En (a) : les ovocytes ont été maintenus à un potentiel de -80 mV puis les courants ont été enregistrés à la suite de sauts de potentiel de -150 à +50 mV par incrément de 20 mV. Les enregistrements ont été réalisés dans un milieu externe contenant une concentration en K^+ de 2 mM ou de 74 mM. En (b) : relation courant-potentiel selon la même expérience qu'en (a). En (c) : renversement de potentiel (E_{rev}) des courants TRAAK en fonction de la concentration externe en K^+ . En (d) : courants enregistrés sur des cellules COS transfectées par TRAAK suivant le même protocole qu'en (a). En (e) : relation courant-potentiel selon la même expérience qu'en (d).

- la figure 5 montre l'effet de l'osmolarité du milieu externe sur des ovocytes ayant reçu une injection d'ARNc TREK-1 ou TASK. En (A) : comparaison des effets de l'application d'une solution hypertonique (417 mOsm, par addition de mannitol) sur des ovocytes témoins (CD8) et sur des ovocytes exprimant TASK ou TREK-1. Les courants sont mesurés après un saut de potentiel de -80 à +80 mV. En inset est montré le courant TREK-1 avant et après (indiqué par une flèche) l'application de la solution hypertonique. En (B) :

effet réversible d'une solution hypertonique (434 mOsm, par addition de sucrose) sur les relations courant-potentiel déduites de rampes de potentiel qui durent 600 msec. En inset est montré la cinétique de l'effet produit par la solution hypertonique. Les courants sont mesurés à 80mV.

la figure 6 montre que TREK-1 est un canal potassium mécanosensible dans les cellules COS transfectées. En (B) : activités canal ($N \cdot P_o$) dans des "patches" de membrane maintenus à 0 mV et obtenus dans la configuration cellule attachée à partir de cellules témoins (CD8), ou de cellules transfectées par TREK-1 et TASK. En (C) l'étirement de la membrane n'a pas d'effet sur l'activité du canal TASK (configuration cellule attachée). Le "patch" est maintenu à 50mV. En (D) : les canaux TREK-1 sont silencieux au repos et ouvert lors d'une tension de la membrane. Le "patch" est maintenu à +50mV. En (E) histogramme donnant l'amplitude de l'activité canal engendrée par la tension de la membrane et illustrée en (G). En (F) : relation courant-potentiel en canal unique de TREK-1 ($n=6$). La conductance de 81 pS a été calculée entre 0 et 80 mV. En (G) : activation de TREK-1 par étirement de la membrane (30 mm Hg) dans la configuration "inside-out". Le potentiel de maintien est 100 mV. En (H) : effet produits par des tensions de plus en plus importantes (5 sec de durée) sur la relation courant-potentiel d'un "patch" exprimant TREK-1. En (I) : courbe dose-effet de l'activation de TREK-1 par la tension ($n=6$). La courbe est tracée en suivant les points expérimentaux suivant la relation de Boltzmann.

la figure 7 montre l'activation de TRAAK par l'étirement de la membrane cellulaire dans les cellules COS transfectées. Le courant est enregistré à 0 mV dans la configuration "inside-out". Les dépressions

appliquées via la pipette d'enregistrement sont indiquées sur la droite des traces.

- la figure 8 montre l'activation de TREK-1 par l'acide arachidonique dans les cellules COS transfectées. En (A) : l'activité de TREK-1 est enregistrée dans la configuration cellule attachée. Le "patch" est stimulé par une rampe de potentiel durant 800 msec toutes les 5 sec. Les courants sont mesurés à 80 mV. Les applications d'acide arachidonique (AA, 10 μ M) sont indiquées par les barres horizontales. Au cours de l'expérience, le "patch" a été stimulé par des tensions de 50 mm Hg (indiquées par des flèches). A 9 min, le "patch" a été excisé dans la configuration "inside-out". En (B) : relations courant-potentiel qui correspondent à l'expérience illustrée en (A). En (C) : activité de TREK-1 dans la configuration cellule attachée avec 10 μ M AA dans la pipette. La rampe de potentiel dure 800 msec et les courants sont mesurés à 80mV. En (D) : relations courant-potentiel en canal unique au moment où la pipette est posée sur la membrane ou après 20 min et 1 min après avoir excisé le "patch" dans la configuration "inside-out". En (E) effet de l'AA (10 μ M) sur le courant TREK-1 enregistré en cellule entière. Le courant est mesuré à 80mV. En (F) : l'AA est sans effet sur le courant TREK-1 mesuré en cellule entière lorsqu'il est dans la pipette. Le courant est mesuré 30 min après avoir rompu le "patch" (trace contrôle) par une rampe de potentiel de 800 msec. Le courant est ensuite mesuré après une application d'AA de 1 min dans le milieu externe (trace AA).

- la figure 9 montre l'effet de l'acide arachidonique et d'autres acides gras sur le canal TRAAK exprimé dans des cellules COS transfectées. En (a) : relations courant-potentiel obtenues à partir de rampes de potentiel de 500 msec allant de -150 à +50 mV, après

application d'AA (10 μ M) et après lavage. En inset sont représentés les courants déclenchés par des sauts de potentiel de -130 à +50 mV par incrément de 20 mV. Le potentiel de maintien est -80mV. En (b) : relation dose-effet de l'activation de TRAAK par l'AA. En (c) : relations courant-potentiel obtenus comme en (a) dans la configuration "outside-out". En inset est montré l'effet de l'AA à 20 mV. En (e) : histogramme représentant le coefficient d'augmentation des courants obtenus après application de différents acides gras (10 μ M). En (f) : histogramme montrant la valeur des courants enregistrés dans la configuration de la cellule entière avant et après application d'AA sur des cellules transfectées transitoirement par TWIK-1, TASK, TREK-1 et TRAAK et sur des cellules transfectées de façon stable par TRAAK. Le coefficient d'augmentation est indiqué dans chaque cas.

la figure 10 montre l'effet du riluzole sur les courants TREK-1 et TRAAK désigné TREK-2. Les relations courant-potentiel sont obtenus comme dans la figure 9a avant et après l'application de riluzole (100 μ M) sur des cellules COS transfectées. En inset sont montrés les effets du riluzole sur les courants enregistrés dans la configuration "outside-out".

1.4- Clonage, structure primaire et distribution tissulaire de TRAAK.

La séquence du canal TWIK-1 a été utilisée pour rechercher des séquences homologues dans les banques publiques de données d'ADN (Genbank et EMBL) en mettant en oeuvre le programme d'alignement BLAST. Il a ainsi été identifié une séquence exprimée TAG humaine qui a servi à cribler une banque d'ADNc de cerveau de souris. Plusieurs clones ont été isolés et caractérisés. Le plus long a été séquencé. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

- les ADNC isolés contiennent une phase ouverte de lecture de 1197 nucléotides codant pour un polypeptide de 398 résidus. Les séquences nucléotidiques et protéiques sont montrées dans la figure 1.

5 - cette protéine contient 4 segments transmembranaires potentiels et deux domaines P. Elle possède donc la même structure générale que les canaux TWIK-1, TREK-1 et TASK. De plus, elle présente des homologues de séquence avec ces canaux : environ 20-25% d'identité avec TWIK-1 et TASK et 38% avec TREK-1. En
10 dehors des domaines P qui sont présents dans tous les canaux potassium clonés, elle n'a pas d'homologie de séquence significative avec les canaux de type *Shaker* et IRK. Elle appartient donc à la famille TWIK-1 et son
15 homologue le plus proche est TREK-1. Ces relations apparaissent dans la figure 2 au niveau de l'alignement des séquences protéiques ainsi que dans le dendrogramme qui est déduit de cet alignement. TRAAK et TREK-1
20 forment donc une sous-classe structurale au sein de la famille TWIK-1.

 - les séquences de différents oligonucléotides ont été déduits à partir de la séquence de TRAAK. Ces oligonucléotides ont permis par RT-PCR
25 d'étudier la distribution du transcrit codant TRAAK dans les tissus de souris adulte. Comme le montre la figure 3, TRAAK est exclusivement exprimé dans des tissus
30 neuronaux : cerveau, cervelet, moelle épinière et rétine. Cette distribution est très différente de celle de son plus proche homologue qui est le canal TREK-1. Celui a une distribution quasi ubiquitaire et est
35 présent aussi bien dans les tissus excitables que dans les tissus non-excitables.

II. - Expression fonctionnelle de TRAAK.

Pour l'étude fonctionnelle, la séquence codante de TRAAK a été insérée dans le vecteur pEXO et un ARN complémentaire (ARNc) a été synthétisé à partir de cette construction et injecté dans des ovocytes de Xénope. Pour l'expression dans les cellules COS, la séquence de TRAAK a été sous-clonée dans un vecteur d'expression sous le contrôle d'un promoteur eucaryote et transfectée dans les cellules. Un courant non-inactivant absent des ovocytes et des cellules témoins a été mesuré par la technique de potentiel imposé comme représenté à la figure 4. L'activation est instantanée et ne peut être résolue car elle est masquée par la décharge capacitive du courant enregistré au début du saut de potentiel. La relation courant-potentiel rectifie dans le sens sortant lorsque la concentration externe en K^+ est égale à 2 mM. Des courants entrants sont observés lorsque la concentration externe en K^+ est augmentée. Quelque soit cette concentration, les courbes courant-potentiel suivent parfaitement la relation de Goldman-Hodgkin-Katz. Cela démontre que les courants TRAAK n'ont pas de rectification autre que celle qui est due aux concentrations dissymétriques de K^+ de chaque côté de la membrane et que TRAAK est un canal qui n'est pas dépendant du potentiel. Le canal TRAAK est sélectif au potassium. Le renversement du potentiel des courants suit le potentiel d'équilibre du K^+ et le changement par 10 de la concentration en K^+ conduit à un changement de la valeur d'inversion du potentiel conforme à celle prédite par l'équation de Nernst (48.7 ± 0.7 mV par 10, $n=4$).

Les propriétés de TRAAK, absence de cinétiques d'activation et d'inactivation aussi bien que son ouverture à tous les potentiels de membrane, sont

des caractéristiques des canaux potassium dits de fuite. Comme prévu pour des canaux de ce type, son expression dans les oocytes est associée à une forte polarisation. Le potentiel de repos de la membrane passe de $-43 \pm 2,4$ mV, (n=7), dans les oocytes de contrôle à $-88 \pm 1,4$ mV, (n=23) dans les oocytes transfectés, une valeur proche du potentiel d'équilibre du potassium. TRAAK a été aussi exprimé dans les cellules COS-M6 transfectées. Dans ce système aussi, les courants TRAAK sont instantanés et ne s'inactivent pas. L'enregistrement des "patch" en configuration "outside-out" indique une conductance unitaire de TRAAK égale à $45,5 \pm 3,7$ pS (n = 10).

III - TREK-1 et TRAAK sont des canaux mécanosensibles.

Il a été établi que la sous-classe structurale formée par les canaux K^+ TREK-1 et TRAAK est associée à des propriétés électrophysiologiques uniques parmi les canaux K^+ de type TWIK. Les canaux TREK-1 et TRAAK sont en effet activés par une tension appliquée à la membrane plasmique. Cette tension est obtenue soit indirectement en changeant l'osmolarité du milieu externe et donc le volume de la cellule soit plus directement en appliquant une dépression dans la pipette d'enregistrement. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

- la figure 5 démontre que l'expression du canal TREK-1 dans des ovocytes de Xénope qui sont maintenus dans un milieu hypotonique induit des courants instantanés et non-inactivants. Quand l'osmolarité du milieu externe est augmentée en y ajoutant du mannitol, une importante diminution de l'amplitude du courant TREK-1 est observée ce qui démontre une sensibilité du canal au volume cellulaire. Le canal TASK lui n'est pas affecté par l'osmolarité du milieu externe.

- la figure 6 démontre que le canal TREK-1 est mécanosensible. Dans des cellules COS transfectées et sous des conditions de repos, l'activité de TREK-1 est indétectable dans la configuration cellule attachée alors que l'activité de TASK est facilement mesurable dans les mêmes conditions. Cependant, une dépression appliquée à la membrane par l'intermédiaire de la pipette d'enregistrement déclenche une ouverture du canal TREK-1. Un tel effet n'est pas vu avec TASK.

L'activation de TREK-1 induit par la tension est également obtenu dans la configuration "inside-out" c'est à dire lorsque le "patch" est excisé et que la face interne de la membrane se retrouve en contact avec le milieu externe. Dans cette configuration, l'activité du canal est également absente ou très faible si on n'applique pas de tension à la membrane. L'effet de la tension est graduée et une activation qui est égale à la moitié de la valeur maximale est détectée pour une dépression équivalente à 23 mm de mercure. D'autre part, la figure 6h montre que l'activation induite par l'étirement est indépendante du potentiel de membrane.

- la figure 7 montre également que TRAAK est un canal activé par l'étirement. En absence de dépression ou pour de faibles valeurs, le canal TRAAK est inactif. Pour des valeurs plus élevées, le canal est activé et un courant est enregistré. Durant l'application de la dépression, une diminution de l'activité du canal est observable comme dans le cas de TREK-1.

IV - TREK-1 et TRAAK sont activés par l'acide arachidonique et d'autres acides gras polyinsaturés.

L'activation des canaux TREK-1 et TRAAK par étirement mécanique de la membrane est mimée par

l'application d'acide arachidonique et par l'application d'autres acides gras polyinsaturés, mais pas par l'application d'acides gras saturés. Les caractéristiques suivantes ont été mises en évidence :

5 - la figure 8 démontre que TREK-1 est activé par l'acide arachidonique (AA). L'application d'AA sur des cellules témoins (CD8) n'a pas d'effet. Les activations obtenues par étirement de la membrane et par application d'AA sont similaires en amplitude mais ne
10 sont pas additives. Les deux types d'activation sont réprimées dans la configuration cellule attachée. Quand la pipette d'enregistrement contient de l'AA, l'excision du "patch" dans la configuration "inside-out" induit de façon reproductible une augmentation importante de
15 l'activité de TREK-1. De la même manière, l'amplitude de l'activation induite par une dépression appliquée dans la pipette d'enregistrement est plus importante lorsque le "patch" est excisé. Finalement, il a été observé qu'en cellule entière, l'AA interne n'active pas TREK-1.
20 Quand la cellule est dialysée pour des périodes aussi longues que 30 minutes, aucune activation du canal par l'AA interne n'a lieu bien que l'activation soit observée quelques secondes après l'application d'AA dans le milieu externe. Ces résultats indiquent que l'AA
25 active TREK-1 seulement lorsqu'il est appliqué sur la face externe de la membrane.

 - la figure 9 démontre que le canal TRAAK est activé par l'AA de la même manière que TREK-1. L'activation est réversible et dépendante de la
30 concentration appliquée. Cette activation est aussi observée dans la configuration "outside-out". L'activation de TRAAK par l'AA n'est pas prévenue quand la perfusion d'AA contient un mélange d'inhibiteurs du métabolisme de l'AA (acide nordihydroguaiarétique pour
35 la lipoxigénase, l'indométhacine pour la cyclooxygénase,

clotrimazole pour époxygénase et l'ETYA qui inhibe l'ensemble des voies de métabolisation de l'AA, tous à 10mM). Dans ces conditions, l'augmentation du courant induit par AA est de 6.6 ± 0.5 fois ($n=3$) (à +50mV). Une augmentation de 1.7 ± 0.4 fois ($n=3$) du courant de potassium de fond peut être observé après l'administration d'un cocktail d'inhibiteurs en l'absence d'AA. Ce résultat démontre que l'activation par l'AA ne requière pas la transformation de l'AA en eicosanoïdes.

la figure 9 démontre également que des acides gras autres que l'AA activent le canal. Cette activation est spécifique des acides gras cis polyinsaturés et est observée avec les acides oléique (C18 Δ 9), linoléique (C18 Δ 9,12), linolénique (C18 Δ 9,12,15), eicosapentaénoïque (EPA, C20 Δ 5,8,11,14,17) et docosohexaénoïques (DOHA, C20 Δ 4,7,10,13,16,19) à une concentration de 10 mM. Les acides saturés tels que les acides palmitique (C16), stéarique (C18) et arachidique (C20) sont quant à eux sans effet. Les dérivés de l'AA et de l'acide docosohexaénoïque où la fonction carboxylique est substituée par une fonction alcool (AA-OH) ou méthyl ester (AA-ME, DOHA-ME) sont également inactifs sur TRAAK. L'effet de l'AA sur TRAAK est observable aussi bien sur des cellules transfectées de façon transitoire que de façon stable (3 lignées de cellules stables indépendantes ont été testées).

Enfin, la figure 9 démontre que l'effet d'activation par l'AA est spécifique de TREK-1 et TRAAK. Aucun effet du même type n'est observé sur les canaux TWIK-1 et TASK.

Dans les oocytes, TRAAK est insensible aux agents bloquant des canaux potassium classiques tels que le tétraéthylammonium (TEA, 1mM), la 4-aminopyridine (4-

AP, 1mM) et la quinine (100 mM): Inversement, Ba^{2+} (1mM) bloque $56,7 \pm 4,6 \%$, $n=5$ du courant TRAAK à +40 mV.

5 V - Les canaux TREK-1 et TRAAK sont activés par un agent neuroprotecteur : le riluzole.

10 Le riluzole est un agent neuroprotecteur qui est utilisé pour prolonger la survie des malades atteints de sclérose latérale amyotrophique. Le figure 10 démontre que cet agent pharmacologique est un ouvreur des canaux TREK-1 et TRAAK. TREK-1 et TRAAK sont les premiers canaux ioniques dont l'activité est stimulée par le riluzole.

LISTE DE SÉQUENCES

(1) INFORMATION GÉNÉRALES:

(iii) NOMBRE DE SÉQUENCES: 2

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1 :

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1794 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRIN: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTÉRISTIQUES

(A) NOM/CLE: TRAAK

(B) EMBLACEMENT: de 284 à 1477

(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCES: SEQ ID NO:1 :

CCACGCGTCC GCGGACGCGT GGGTCGCCCCA CGCGTCCGGT GCGGGCTGTC CTGAGCCCCG	60
GGCCAGCTGA TGTCCAGGTT AGGGCAGCGT TGGGGCCCCA ATCCCAGCCT GGAAGGTTGG	120
ACTTCACGTC GACCCTTCTC TGAGTCTTCT GCCACTCACT GGCCTGGACA AGACAGCATT	180
GGGGAGCCCCA GAGGCTGCAG GTGCAGTGAC CACTGCTCCC CAGGAGCTCC CTGCTCCTTC	240
TTCCCAGGCA GGAAGTGGAG CTGGACCTGC CTCTGGAAGG ACC ATG CGC AGC ACC	295
Met Arg Ser Thr	
1	
ACA CTC CTG GCT CTG CTG GCA CTG GTG CTG CTT TAC TTG GTA TCT GGG	343
Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Leu Tyr Leu Val Ser Gly	
5 10 15 20	
GCT CTA GTG TTC CAG GCT CTG GAG CAG CCT CAC GAG CAG CAG GCT CAG	391
Ala Leu Val Phe Gln Ala Leu Glu Gln Pro His Glu Gln Gln Ala Gln	
25 30 35	
AAG AAA ATG GAT CAT GGC CGA GAC CAG TTT CTG AGG GAC CAT CCC TGT	439
Lys Lys Met Asp His Gly Arg Asp Gln Phe Leu Arg Asp His Pro Cys	
40 45 50	
GTG AGC CAG AAG AGC CTG GAG GAT TTC ATC AAG CTC CTG GTT GAA GCC	487
Val Ser Gln Lys Ser Leu Glu Asp Phe Ile Lys Leu Leu Val Glu Ala	
55 60 65	
CTG GGA GGG GGC GCA AAC CCA GAA ACC AGC TGG ACC AAT AGC AGC AAC	535
Leu Gly Gly Gly Ala Asn Pro Glu Thr Ser Trp Thr Asn Ser Ser Asn	
70 75 80	
CAC TCA TCA GCT TGG AAC CTG GGC AGC GCC TTC TTT TTC TCG GGG ACC	583
His Ser Ser Ala Trp Asn Leu Gly Ser Ala Phe Phe Phe Ser Gly Thr	
85 90 95 100	
ATC ATC ACT ACC ATC GGC TAT GGC AAT ATA GTC TTA CAC ACA GAT GCC	631
Ile Ile Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asn Ile Val Leu His Thr Asp Ala	
105 110 115	

GGG	CGT	CTC	TTT	TGT	ATC	TTC	TAT	GCA	CTG	GTG	GGG	ATC	CCA	CTG	TTC	679
Gly	Arg	Leu	Phe	Cys	Ile	Phe	Tyr	Ala	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Leu	Phe	
		120						125					130			
GGG	ATG	CTG	CTG	GCG	GGA	GTC	GGG	GAC	CGG	CTG	GGC	TCC	TCT	CTG	CGC	727
Gly	Met	Leu	Leu	Ala	Gly	Val	Gly	Asp	Arg	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Arg	
		135					140					145				
CGG	GGC	ATC	GGC	CAC	ATC	GAA	GCA	ATC	TTC	TTG	AAG	TGG	CAT	GTG	CCA	775
Arg	Gly	Ile	Gly	His	Ile	Glu	Ala	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp	His	Val	Pro	
	150					155					160					
CCG	GGG	CTG	GTG	AGA	AGT	CTG	TCC	GCA	GTG	CTC	TTC	CTG	CTG	ATC	GGC	823
Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	
165						170				175					180	
TGC	CTG	CTC	TTT	GTC	CTC	ACT	CCT	ACC	TTC	GTG	TTC	TCC	TAC	ATG	GAG	871
Cys	Leu	Leu	Phe	Val	Leu	Thr	Pro	Thr	Phe	Val	Phe	Ser	Tyr	Met	Glu	
				185					190					195		
AGC	TGG	AGC	AAG	TTA	GAA	GCC	ATC	TAC	TTT	GTT	ATA	GTG	ACT	CTC	ACC	919
Ser	Trp	Ser	Lys	Leu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Val	Ile	Val	Thr	Leu	Thr	
			200					205					210			
ACT	GTA	GGC	TTT	GGC	GAT	TAT	GTA	CCC	GGC	GAT	GGC	ACC	GGG	CAG	AAC	967
Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Tyr	Val	Pro	Gly	Asp	Gly	Thr	Gly	Gln	Asn	
		215					220					225				
TCT	CCA	GCC	TAC	CAG	CCG	CTG	GTG	TGG	TTC	TGG	ATC	TTG	TTT	GGC	CTA	1015
Ser	Pro	Ala	Tyr	Gln	Pro	Leu	Val	Trp	Phe	Trp	Ile	Leu	Phe	Gly	Leu	
	230					235					240					
GCC	TAC	TTC	GCC	TCA	GTG	CTC	ACC	ACC	ATC	GGC	AAC	TGG	TTG	CGA	GCA	1063
Ala	Tyr	Phe	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Asn	Trp	Leu	Arg	Ala	
245					250					255					260	
GTG	TCC	CGC	CGA	ACT	CGG	GCA	GAG	ATG	GGT	GGC	CTA	ACG	GCA	CAG	GCT	1111
Val	Ser	Arg	Arg	Thr	Arg	Ala	Glu	Met	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	Gln	Ala	
				265					270					275		
GCT	AGC	TGG	ACC	GGC	ACA	GTG	ACA	GCG	CGA	GTG	ACC	CAG	CGA	ACT	GGG	1159
Ala	Ser	Trp	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ala	Arg	Val	Thr	Gln	Arg	Thr	Gly	
			280					285				290				
CCC	AGC	GCC	CCG	CCG	CCA	GAG	AAG	GAG	CAA	CCA	CTC	CTG	CCC	TCC	TCT	1207
Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Glu	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Ser	
		295					300					305				
TTG	CCG	GCA	CCG	CCT	GCT	GTT	GTT	GAG	CCA	GCC	GGC	AGG	CCC	GGC	TCC	1255
Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Val	Val	Glu	Pro	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser	
	310					315					320					
CCT	GCA	CCC	GCA	GAG	AAG	GTT	GAG	ACT	CCG	TCC	CCG	CCC	ACG	GCC	TCA	1303
Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Lys	Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr	Ala	Ser	
325					330					335					340	
GCT	CTG	GAT	TAC	CCC	AGT	GAG	AAT	CTG	GCC	TTC	ATC	GAC	GAG	TCC	TCA	1351
Ala	Leu	Asp	Tyr	Pro	Ser	Glu	Asn	Leu	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Ser	Ser	
				345					350					355		

GAC ACG CAG AGT GAG CGT GGC TGT GCC CTG CCT CGG GCT CCT CGG GGT	1399
Asp Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Ala Leu Pro Arg Ala Pro Arg Gly	
360 365 370	
CGC CGC CGA CCC AAC CCA TCC AAA AAG CCT TCC AGA CCC CGG GGT CCT	1447
Arg Arg Arg Pro Asn Pro Ser Lys Lys Pro Ser Arg Pro Arg Gly Pro	
375 380 385	
GGG CGA CTC CGA GAC AAG GCC GTG CCG GTG TAG GGGCAGGATC	1490
Gly Arg Leu Arg Asp Lys Ala Val Pro Val *	
390 395 398	
TCTGGACCCG GATCCACGCG CAGGGCTTTC GCTCTTGCTG ATGCTCAGGC ATGCTTGGCT	1550
TATTTGACCA AAGAGCCGTC CCTCTTTTGT TCCACGTGGT TGCAACCCTG ACAGGAGTCC	1610
AGTGGTTGCC AAATGCCACC GCTCTTCCCT GGCTGGTTCT TCACATCCAA TCATTTCCTAA	1670
AGCCCACCAT CCAAGGCTTT CTGCCTCGCT CCCCTGCCGG TTTTGACCCT CACACCTCAC	1730
AACTGTGCCT CAAAACCTGC ACCAATAAAA CAAAAACTCT GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1790
AAAA	1794

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2 :

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: ... paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRIN: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN.

(ix) CARACTÉRISTIQUES

(A) NOM/CLE: TREK-1

(B) EMPLACEMENT: de 484 à 1596

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:2 :

AGAGCGGCGA	GGCGAGGGGA	GAGTGGTGCT	ACGGGCCAGG	CGGGCCACCC	CGGGCCACAC	60
CCCCACCTTG	CGGGCGCCCG	GCGGGGCTCG	AGCCAGGCGG	GGCGCCTCAC	AAAGACATGC	120
GAAGAGGGGC	TGCAGTGATC	ACCCCTCTCG	TGAGCCCCGG	GGCAGAGCCC	AGCCGCCGGC	180
CGAGCGCACG	GAGCCACGGG	CCGAGCGCAC	CCAGGGCCCG	CGCGGGACCC	CAGGCGGCCA	240
CGCAATCGGG	GTGACCCATC	GCGCGCGGGG	GCGTCGTCGT	CCGATCCCAA	CTTGCCCTCG	300
GCCTCGCCCT	CTGCCAGCC	TGCCACCGCT	GGTGTCTCT	CCTTCGGCG	ATTTCTTTTC	360
TTCTCAGCT	CCCCCTCTA	TACCCCTCCC	GCCTCCAGCC	CCGCTCTCCC	CACCTTGTA	420
AACAAAGCCG	GGGAAATGC	CTACCCGTGC	AGCTCGGAGC	GCGCAGCCCG	TCTTGGAATA	480
AGG ATG GCG GCC CCT GAC TTG CTG GAT CCC AAG TCT GCT GCT CAG AAC	528					
Met Ala Ala Pro Asp Leu Leu Asp Pro Lys Ser Ala Ala Gln Asn						
1 5 10 15						
TCC AAA CCG AGG CTC TCA TTC TCT TCA AAA CCC ACC GTG CTT GCT TCC	576					
Ser Lys Pro Arg Leu Ser Phe Ser Ser Lys Pro Thr Val Leu Ala Ser						
20 25 30						
CGG GTG GAG AGT GAC TCG GCC ATT AAT GTT ATG AAA TGG AAG ACA GTC	624					
Arg Val Glu Ser Asp Ser Ala Ile Asn Val Met Lys Trp Lys Thr Val						
35 40 45						
TCC ACG ATT TTC CTG GTG GTC GTC CTC TAC CTG ATC ATC GGA GCC GCG	672					
Ser Thr Ile Phe Leu Val Val Val Leu Tyr Leu Ile Ile Gly Ala Ala						
50 55 60						
GTG TTC AAG GCA TTG GAG CAG CCT CAG GAG ATT TCC CAG AGG ACC ACC	720					
Val Phe Lys Ala Leu Glu Gln Pro Gln Glu Ile Ser Gln Arg Thr Thr						
65 70 75						
ATT GTG ATC CAG AAG CAG ACC TTC ATA GCC CAG CAT GCC TGC GTC AAC	768					
Ile Val Ile Gln Lys Gln Thr Phe Ile Ala Gln His Ala Cys Val Asn						
80 85 90 95						
TCC ACC GAG CTG GAC GAA CTC ATC CAG CAA ATA GTG GCA GCA ATA AAC	816					
Ser Thr Glu Leu Asp Glu Leu Ile Gln Gln Ile Val Ala Ala Ile Asn						
100 105 110						
GCA GGG ATT ATC CCC TTA GGA AAC AGC TCC AAT CAA GTT AGT CAC TGG	864					
Ala Gly Ile Ile Pro Leu Gly Asn Ser Ser Asn Gln Val Ser His Trp						
115 120 125						

GAC CTC GGA AGC TCT TTC TTC TTT GCT GGT ACT GTT ATC ACA ACC ATA Asp Leu Gly Ser Ser Phe Phe Phe Ala Gly Thr Val Ile Thr Thr Ile 130 135 140	912
GGA TTT GGA AAC ATC TCC CCA CGA ACT GAA GGT GGA AAA ATA TTC TGC Gly Phe Gly Asn Ile Ser Pro Arg Thr Glu Gly Gly Lys Ile Phe Cys 145 150 155	960
ATC ATC TAT GCC TTG CTG GGA ATT CCC CTC TTT GGC TTT CTA CTG GCT Ile Ile Tyr Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Phe Gly Phe Leu Leu Ala 160 165 170 175	1008
GGG GTT GGT GAT CAG CTA GGA ACT ATA TTT GGA AAA GGA ATT GCC AAA Gly Val Gly Asp Gln Leu Gly Thr Ile Phe Gly Lys Gly Ile Ala Lys 180 185 190	1056
GTG GAA GAC ACA TTT ATT AAG TGG AAT GTT AGT CAG ACG AAG ATT CGT Val Glu Asp Thr Phe Ile Lys Trp Asn Val Ser Gln Thr Lys Ile Arg 195 200 205	1104
ATC ATC TCC ACC ATC ATC TTC ATC CTG TTT GGC TGT GTC CTC TTT GTG Ile Ile Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Phe Gly Cys Val Leu Phe Val 210 215 220	1152
GCT CTC CCT GCG GTC ATA TTC AAG CAC ATA GAA GGC TGG AGC GCC CTG Ala Leu Pro Ala Val Ile Phe Lys His Ile Glu Gly Trp Ser Ala Leu 225 230 235	1200
GAC GCT ATC TAT TTT GTG GTT ATC ACT CTG ACG ACC ATT GGA TTT GGA Asp Ala Ile Tyr Phe Val Val Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Phe Gly 240 245 250 255	1248
GAC TAC GTG GCA GGT GGA TCA GAC ATT GAA TAT CTG GAC TTC TAC AAG Asp Tyr Val Ala Gly Gly Ser Asp Ile Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Lys 260 265 270	1296
CCT GTG GTG TGG TTC TGG ATC CTC GTT GGG CTG GCC TAC TTT GCA GCT Pro Val Val Trp Phe Trp Ile Leu Val Gly Leu Ala Tyr Phe Ala Ala 275 280 285	1344
GTT CTG AGC ATG ATT GGG GAC TGG CTA CGG GTG ATC TCT AAG AAG ACG Val Leu Ser Met Ile Gly Asp Trp Leu Arg Val Ile Ser Lys Lys Thr 290 295 300	1392
AAG GAA GAG GTG GGA GAG TTC AGA GCG CAT GCC GCT GAG TGG ACA GCC Lys Glu Glu Val Gly Glu Phe Arg Ala His Ala Ala Glu Trp Thr Ala 305 310 315	1440
AAT GTC ACG GCC GAG TTC AAG GAA ACG AGG AGG CGG CTG AGC GTG GAG Asn Val Thr Ala Glu Phe Lys Glu Thr Arg Arg Arg Leu Ser Val Glu 320 325 330 335	1488
ATC TAC GAC AAG TTC CAG CGT GCC ACA TCC GTG AAG CGG AAG CTC TCC Ile Tyr Asp Lys Phe Gln Arg Ala Thr Ser Val Lys Arg Lys Leu Ser 340 345 350	1536
GCA GAG CTG GCG GGC AAC CAC AAC CAG GAA CTG ACT CCG TGT ATG AGG Ala Glu Leu Ala Gly Asn His Asn Gln Glu Leu Thr Pro Cys Met Arg 355 360 365	1584
ACC TGT CTG TGA ACCACCTGAC CAGCGAGAGG GAAGTCCTGC CTCCTTGCT Thr Cys Leu * 370	1636

GAAGGCTGAG	AGCATCTATC	TGAACGGTCT	GACACCACAC	TGTGCTGGTG	AGGACATAGC	1696
TGTCATTGAG	AACATGAAGT	AGCCCTCTCT	TGGAAGAGTC	TGAGGTGGAG	CCATAGGGAA	1756
GGGCTTCTCT	AGGCTCTTTG	TGACTGTTGC	CGGTAGCATT	TAAACATTGT	GCATGGTGAC	1816
CTCAAAGGGA	AAGCAAATAG	AAAACACCCA	TCTGGTCACC	TTACATCCAG	GGAGGGTGTT	1876
GTCCCGAGGC	GGCACTCTGA	GGATGCCGTG	TGCTGTCCGC	TGAGTGCTGA	GTGATGGACA	1936
GGCAGTGTCT	GATGCCTTTT	GTGCCCAGAC	TGTTTCCCCT	CCCCCTCTCT	CCTAACG	1993

Feuille 2

REVENDEICATIONS

5 1) Protéine purifiée constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2, dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:2.

suite p. 1

20 4) Anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

25 5) Molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30 6) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 5 comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 284 et 1477 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire.

35 7) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 5 comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 484 et 1596 de la séquence représentée

suite p. 1

dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou sa séquence complémentaire.

5 8) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 avantageusement associé à des séquences de contrôle.

10 9) Procédé de production d'une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste :

15 - à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant ledit canal potassium,

20 - à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant lesdits canaux.

25 10) Procédé d'expression d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8 dans un hôte cellulaire,

30 - à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production desdits canaux potassium.

35 11) Hôte cellulaire obtenu par un procédé selon la revendication 10.

12) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 11, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux.

13) Procédé selon la revendication 12 appliqué au criblage de substances capables de prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

14) Utilisation d'une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter des maladies du coeur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

15) Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter les pathologies cardiaques et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires.

16) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou un anticorps selon la revendication 4, ou une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7 ou un vecteur selon la revendication 8, éventuellement associé à un véhicule physiologiquement acceptable.

REVENDICATIONS

1) Protéine purifiée constituant un canal potassium mécanosensible activé par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole, à l'exclusion de la protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID. : 2.

2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No:1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

3) Anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou dont la séquence est représentée dans la liste en annexe sous le numéro SEQ ID. : 2.

4) Molécule d'acide nucléique purifiée comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 à l'exclusion de la molécule d'acides nucléiques dont la séquence en nucléotides est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID. : 2.

5) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 4 comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 284 et 1477 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire.

6) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 4 à 5 avantageusement associé à des séquences de contrôle.

7) Procédé de production d'une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 4 à 5 ou un vecteur selon la revendication 6 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant ledit canal potassium,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant lesdits canaux.

8) Procédé d'expression d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 4 à 5 ou un vecteur selon la revendication 6 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production desdits canaux potassium.

9) Hôte cellulaire obtenu par un procédé selon la revendication 8.

10) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux potassium mécanosensibles activés par les acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique et par le riluzole selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou dont la séquence est représentée dans la liste en annexe sous le numéro SEQ ID. : 2, caractérisé en ce que l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules selon la revendication 11, puis l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux.

11) Procédé selon la revendication 10 appliqué au criblage de substances capables de prévenir ou traiter des maladies du cœur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

12) Utilisation d'une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 ou dont la séquence est représentée dans la liste en annexe sous le numéro SEQ ID. : 2, pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter des maladies du cœur ou du système nerveux chez un sujet humain ou animal.

13) Utilisation selon la revendication 12, pour la préparation d'un médicament utile pour prévenir ou traiter les pathologies cardiaques et vasculaires, les neurodégénérescences, particulièrement celles qui sont associées aux ischémies et aux anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies dans la sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires

14) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal potassium selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou un anticorps selon la revendication 3, ou une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 4 et 5 ou un vecteur selon la revendication 6, éventuellement associé à un véhicule physiologiquement acceptable.

Fig. 1

[illegible]

Fig.2

TWIK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTV	MLOS	LAGSSCVRLV
TREK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTV	LAGSRVESDSA	
TASK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTV		
TAAK	1	MAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSSKPTV		
M1				
TWIK	15	ERHSAWCFGFLVLYLLYLVLFGAVVFSSVELPYEDLL		
TREK	39	INVMKWKTVSTIFLVVLYLIIGAAVFKALEOPQELISQ		
TASK	1	MKRNQVRLALIVCTFTYLLVGAAVFDALSEPELIE		
TAAK	1	MRSTLLALLALVLLYLVSGALVFQALEOPHQQQA		
P1				
TWIK	53	RQELRKLRKRRFLEEHECLSEQQLQFLGRVLEASNYGV		
TREK	77	RTTIVIQKOTFIAQHACVNSTELDELQQIVAAINAGI		
TASK	38	RQRLELRQOELRARYNLSGGYEELERVVLR--LKP		
TAAK	36	QKKMDHGRDOFLRDHPCVSOKSLEDFIKLLVEALGGGA		
P2				
TWIK	91	SVLS--NASSG-NWNWDETSALFFASTVLSTTGYGHTV		
TREK	115	PLG--NSSNOVSHWDLGSSFFFAAGTVITTIIGGNIS		
TASK	72	HKAG--VQWRFAAGSFYFAITVITTIIGYGHAA		
TAAK	74	NPIETSWTNSSNHSSAWNLSAFFFSGTITTIIGYGNIV		
M2				
TWIK	125	PLSDGGKAFCIIYSVIGIPPTLLFLTAVVORITVHVT		
TREK	150	PRTEGGKIFCIYALLGIPLFGLLAGVGDOLGTIFGK		
TASK	101	PSTDGGKVFCMFYALLGIPLLVMFOSLGERINTLVAG		
TAAK	112	LHTDAGRLFCTFYALVGIPLFGLMLLAGVGDRLLSSLR		
M3				
TWIK	163	--RPVLYFHIRWGFSGQVVAIVHAVLLGFVTVSCFFFI		
TREK	188	GIHAKVEDTFIKWNVSTKIRISTIFILFGCVLFVAL		
TASK	139	--LLHRAKKGLGMRRADVSMANMVLIGFFSCISTLCI		
TAAK	150	GIGHIEAIFLKWHVPGLVRSLSAVLFLLIGCLFVLT		
P2				
TWIK	199	PAAVFSVL EDDWNFLSFYFCFISLSTIGLGDYVPG-E		
TREK	226	PAVIFKHIEG-WSALDAIYFVITLTTIGFGDYVAG-G		
TASK	174	GAAAFSHYEH-WTFEQAYYCFITLTTIGFGDYVALQK		
TAAK	188	PTFFVFSYMES-WSKLEAIYFVIVTLTTIGFGDYVPG-D		
M4				
TWIK	236	GYNOKFRELYKIGITCYLLGLIAMLVVLETECELHEL		
TREK	262	SDIEYLDFYKPVWFWILVGLAYFAAVLSMIGOWLRV		
TASK	211	DQALQTOPQYVAFS FVILTGLTVIGAFNLVLRFT		
TAAK	224	GTGONS-PAYOPLVWFWILFGLAYFASVLTITGNWLR		
VH1				
TWIK	274	KKFRKMFYVKKDKDEDO-----VH1IEHD-		
TREK	299	ISKTKKEEVGEFRAHAAE-----WTANVTAEFKETR-		
TASK	249	MNAEDEKRDATHRALLTRNGQAGGGGGGSAHTITDAS		
TAAK	261	VSRRTTRAEMGGLTAQAAS-----WTGTVTARVTQRTG		
OLS				
TWIK	298	-----OLS		
TREK	330	STAAAGGGGFRNVYAEVLHFQSMCSCLWYKSREKLOYS		
TASK	287	PSAPPPE-----KEQPLLPSLPPAPVVEPAGRP		
TAAK	293	PSAPPPE-----KEQPLLPSLPPAPVVEPAGRP		
FSS				
TWIK	301	FSSITDQAAG-----MK--E-DOKQNEPFVATOS-SACV		
TREK	333	SVEIYDKFOR-----ATSVKRLSAELAGNHNOELTPCM		
TASK	325	IPMIIPRDLSTSDTCVEQSHSSPGGGGRYSDTPS		
TAAK	324	SPAPAEKVETPSPPTASALDYPSENLAFIDESSDTQSE		
DGPANH				
TWIK	331	DGPANH-----		
TREK	367	RTCL-----		
TASK	359	RRCLCSGAPPSA ISSVSTGLHSLSTFRGLMKRRSSV-		
TAAK	362	RGCALPRAPRGRRGNPSPKPSRPRGPGRLRDKAVPV		

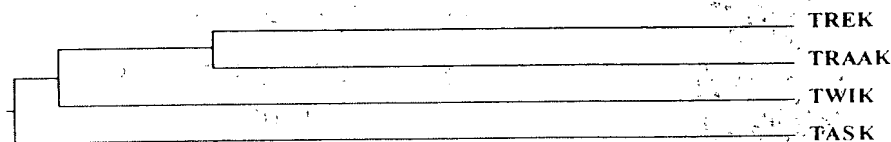


Fig.3

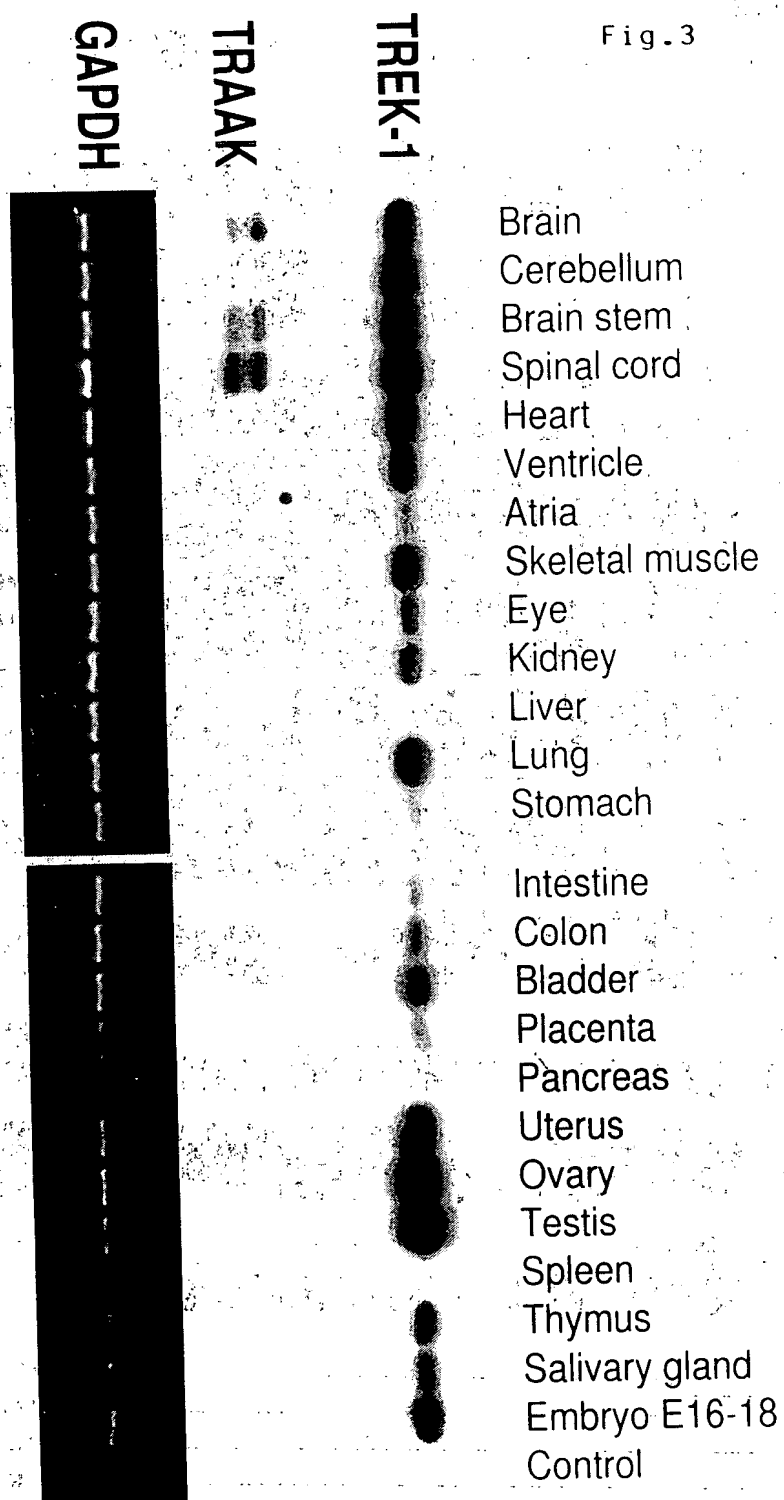


Fig. 4

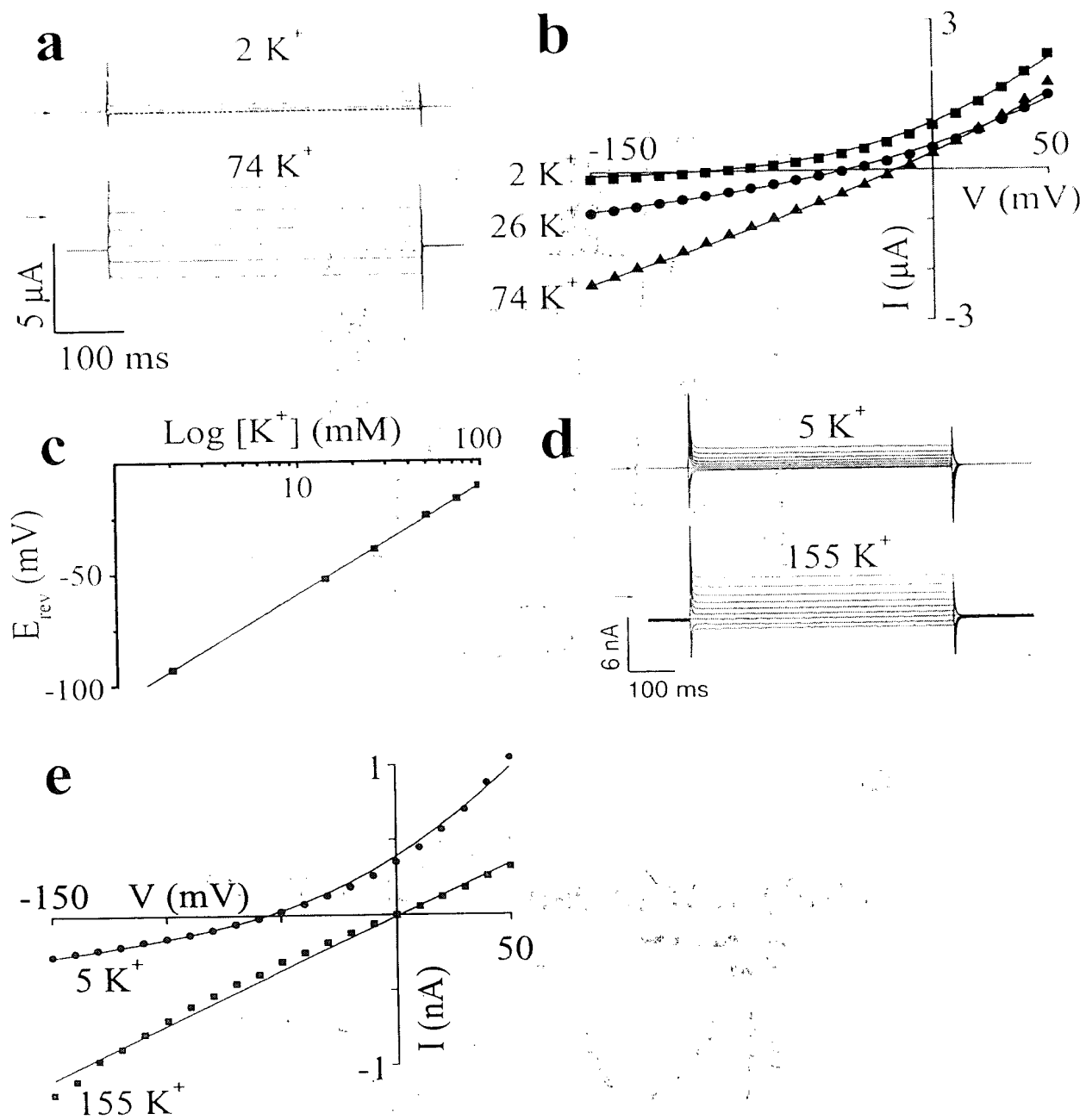


Fig.5

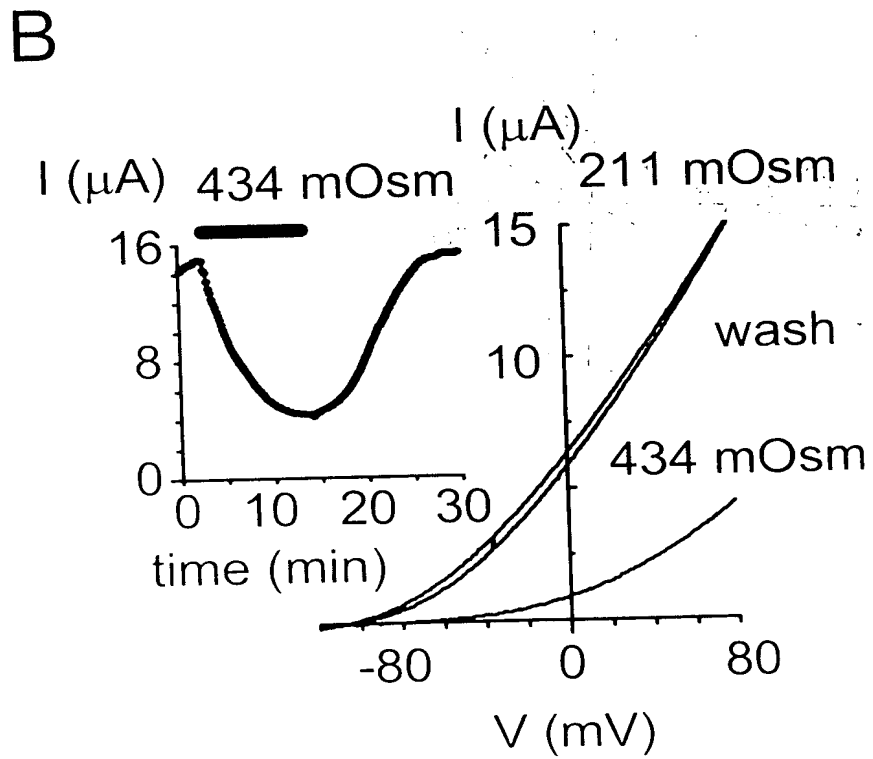
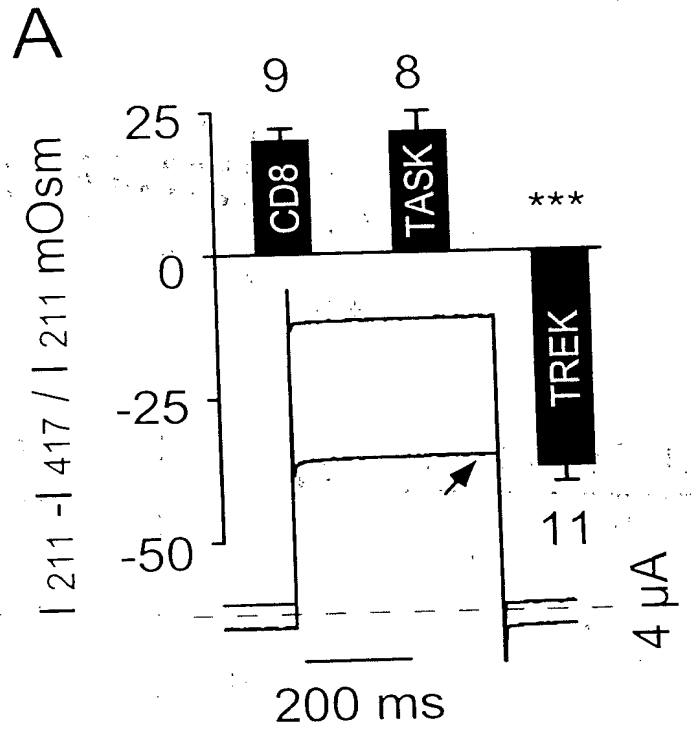


Fig. 6

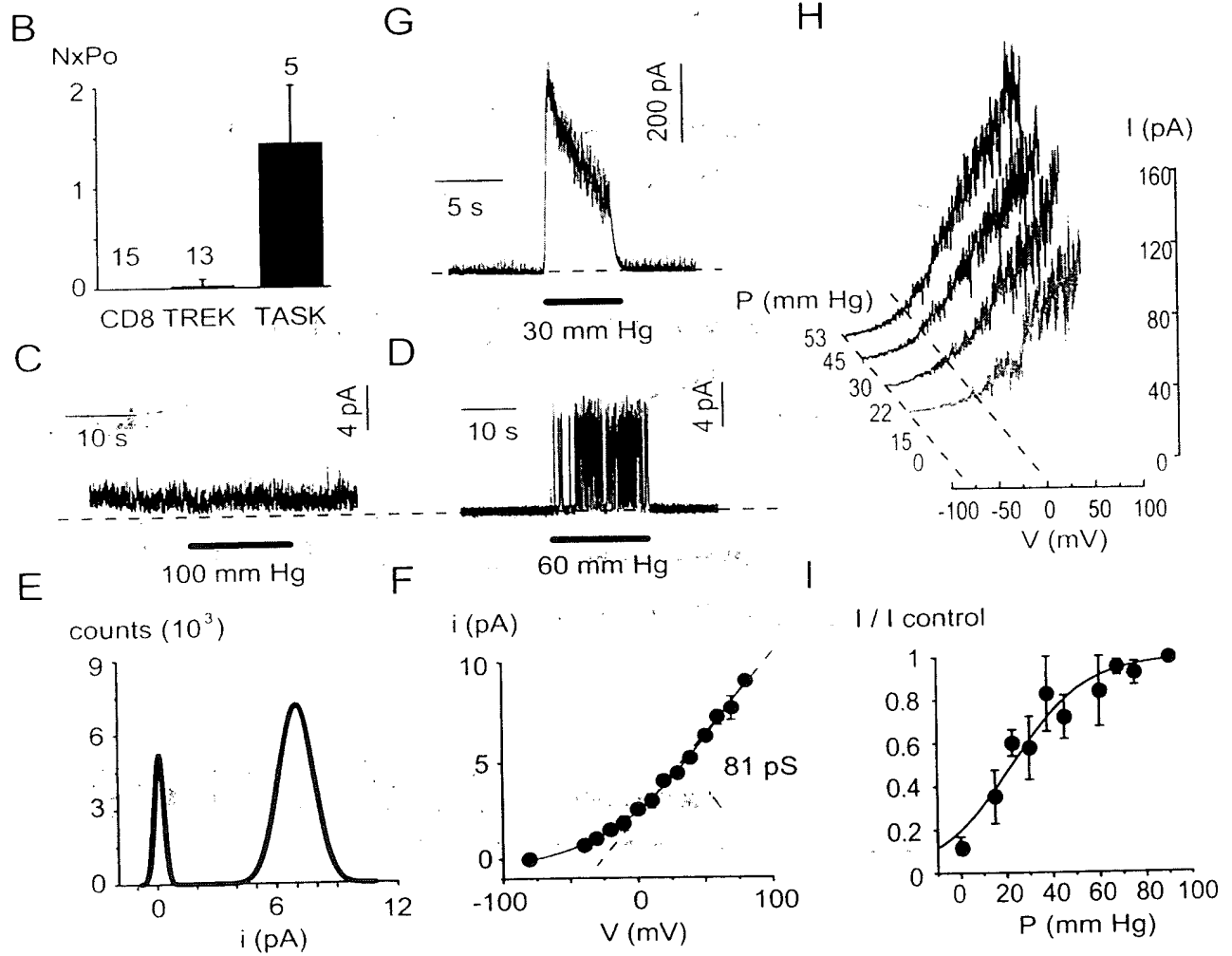


Fig. 7

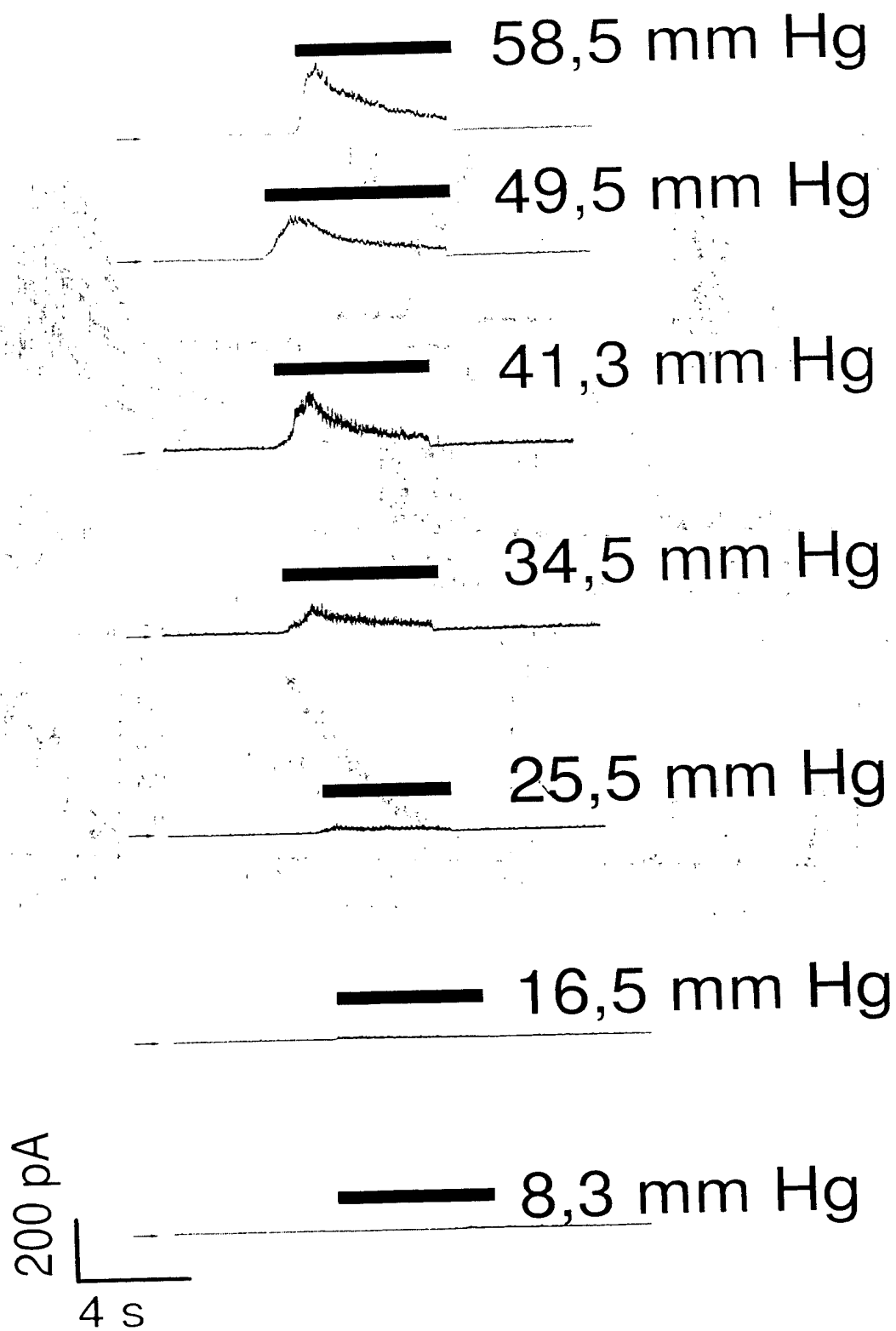


Fig.8

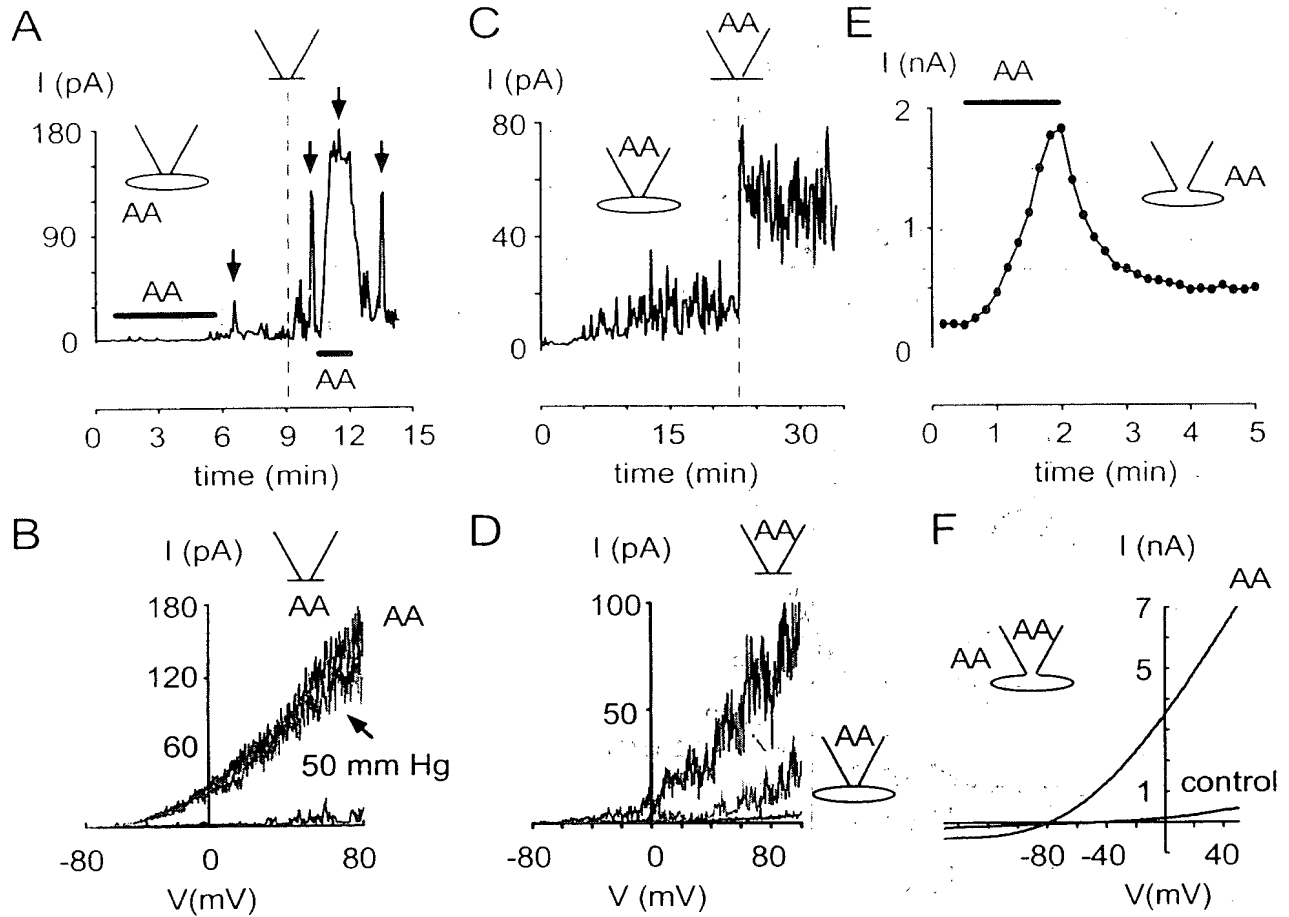


Fig. 9

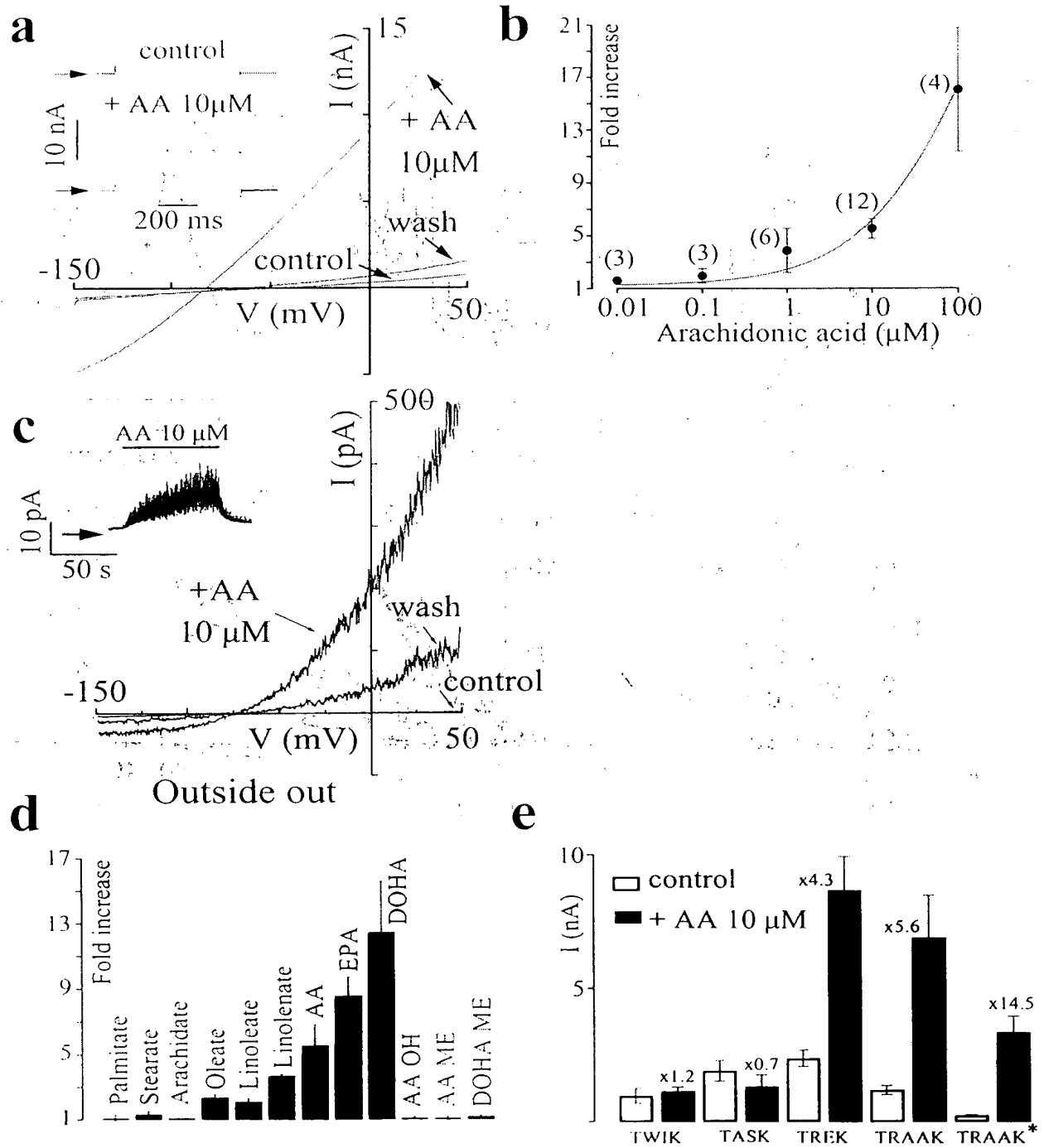
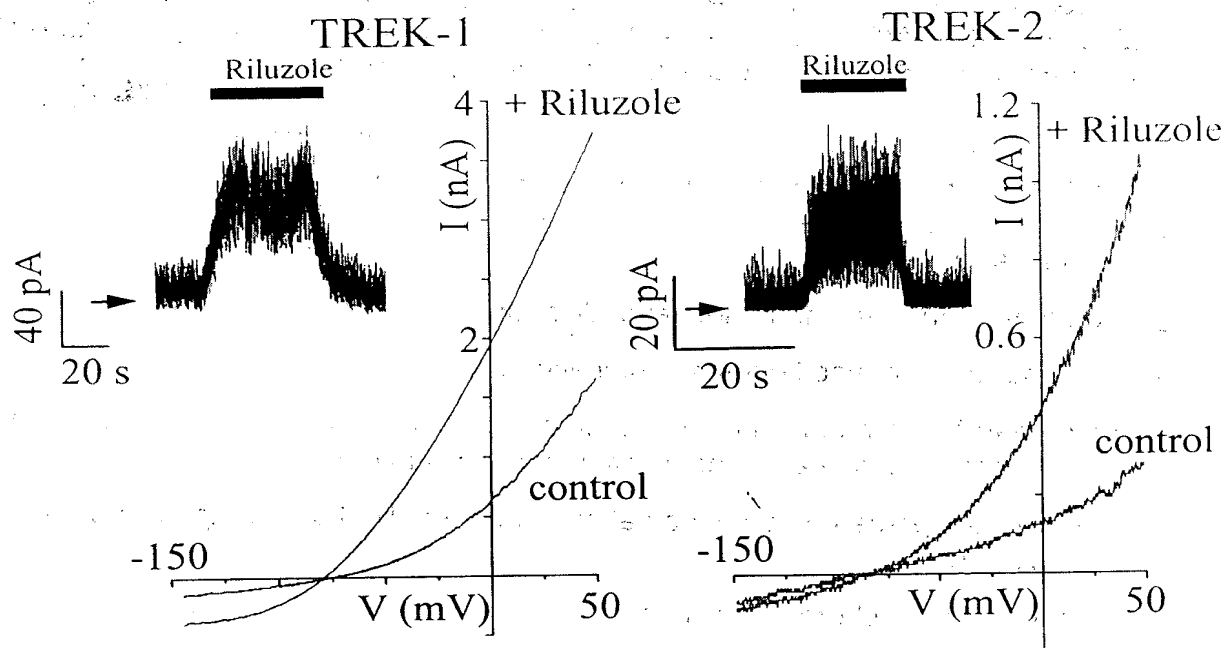


Fig. 10



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>FINK M. ET AL. " Cloning functional expression an brain Localization of a novel unconventional outward rectifier K+ Channel "</p> <p>EMBO JOURNAL, vol 15 . 1996, pages 6854-6862, XP002085602</p> <p>EYNHAM OXFORD GB</p> <p>Le document en entier</p>	1-9
<p>FR 2 744 730 A (CENTRE NAT RECH SCIENT)</p> <p>14 août 1997</p> <p>abrégé</p>	1,10-12
<p>KIM D. " A mechanosensitive K+ channel in heart cells "</p> <p>JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY vol. 100, no.6, 1992, Pages 1021-1040, XP002085599</p> <p>Abrégé</p>	1,10-12
<p align="center">2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL</p> <p>FINK M ET AL " A neuronal two p domain K+ channel stimulated by Arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids " EMBO JOURNAL Vol. 17, no. 12, 15 juin 1998, pages 3297-3308, XP002085600</p> <p>EYNHAM OXFORD GM</p> <p>Document ne faisant pas partie de l'état de la technique</p> <p>PATEL A.J. ET AL. " A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K+ channel " EMBO JOURNAL vol. 17, no. 15, 3 août 1998, Pages 4283-4290, XP002085601 EYNHAM OXFORD GB</p> <p>Document ne faisant pas partie de l'état de la technique</p> <p>WO 96 03415 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC)</p> <p>8 février 1996</p>	
<p align="center">3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES</p>	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

